

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年9月26日 (26.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/074318 A1

(51) 国際特許分類:	A61K 31/728,	(72) 発明者: および 発明者/出願人(米国についてのみ): 浅利 畏 (ASARI,Akira) [JP/JP]; 〒358-0053 埼玉県 入間市 大 字仏子 760 9番地 2 ダイアパレス 4 10 Saitama (JP); 萩原仁 (KURIHARA,Hitoshi) [JP/JP]; 〒208-0003 東京都 武蔵村山市 中央二丁目 2 19番 2号 クレイド ルマンション 302 Tokyo (JP).
(21) 国際出願番号:	PCT/JP02/02433	
(22) 国際出願日:	2002年3月14日 (14.03.2002)	
(25) 国際出願の言語:	日本語	(74) 代理人: 小栗昌平, 外 (OGURI,Shohei et al.); 〒107- 6028 東京都港区 赤坂一丁目 1 2番 3号 アーク森 ビル 2 8階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).
(26) 国際公開の言語:	日本語	
(30) 優先権データ: 特願2001-074077 2001年3月15日 (15.03.2001) JP 特願2001-074078 2001年3月15日 (15.03.2001) JP	(81) 指定国 /国内: AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.	
(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP]; 〒103-0023 東京都 中央区 日本橋本町二丁目 1番 5号 Tokyo (JP).		

(続葉有)

(54) Title: IL-12 EXPRESSION CONTROLLING AGENTS

(54) 発明の名称: IL-12 発現調節剤

(57) Abstract: It is intended to provide IL-12 expression controlling agents, expression inhibitors and IL-12 expression potentiators for oral administration containing hyaluronic acid as the active ingredient. Interleukin 12 expression controlling agents containing hyaluronic acid as the active ingredient. More specifically, interleukin 12 expression inhibitors containing hyaluronic acid having a weight-average molecular weight of 600,000 to 3,000,000 or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the active ingredient; and interleukin 12 expression potentiators for oral administration containing hyaluronic acid having a weight-average molecular weight of from 50,000 to 400,000 or a pharmaceutically acceptable salt thereof as the active ingredient.

(57) 要約:

本発明は、ヒアルロン酸を有効成分とする IL-12 発現調節剤、発現抑制剤、及び経口投与用の IL-12 発現増強剤を提供することを目的とする。

本発明は、ヒアルロン酸を有効成分とするインターロイキン 12 発現調節剤である。具体的には、重量平均分子量 60 万～300 万のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、インターロイキン 12 発現抑制剤であり、また、重量平均分子量 5 万～40 万のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、経口投与用のインターロイキン 12 発現増強剤である。

WO 02/074318 A1

WO 02/074318 A1



(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明細書

I L - 1 2 発現調節剤

技術分野

本発明は、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、インターロイキン12（IL-12）発現調節剤に関する。

また本発明は、重量平均分子量60万～300万のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、インターロイキン12（IL-12）発現抑制剤に関する。

また本発明は、重量平均分子量5万～40万のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、経口投与用のインターロイキン12（IL-12）発現増強剤に関する。

また本発明は、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、経口投与用のインターロイキン12（IL-12）発現調節剤に関する。

背景技術

IL-12は、35kD（p35）および40kD（p40）の二つのポリペプチド鎖が結合してなる70kDの糖タンパク質（p70）からなるサイトカインであり、生体の免疫機能の調節において中心的役割を果たしていることが知られている（笠倉新平編、「サイトカイン」、第2版改訂新版、第207～225頁、株式会社日本医学館発行、1997年6月29日）。

IL-12は、ヘルパーT細胞のTヘルパー1細胞サブセット（Th1）の分化誘導に働くため、Th1の活性化が関連する自己免疫疾患では、病態の進行に促進的に働くことが知られている。

J. Immunol. 165(4), p1863-1870 (2000)には、ヒアルロン酸のオリゴ糖は樹状細胞(dendritic cell)のIL-12産生を増加させるが、分子量80,000～200,000や分子量1,000,000～600,000のヒアルロン酸にはこのような作用がないことが

記載されている。しかし、ヒアルロン酸が IL-12 の産生を抑制することについては記載も示唆もない。

一方、IL-12 は、ヘルパーT細胞のTヘルパー1細胞サブセット (Th1) の分化誘導等に関与するサイトカインとして、微生物感染に対して防御的役割を果たしたり、抗腫瘍効果を有していることが知られている。

J. Immunol. 159(5), p2492 - 2500 (1997) には、分子量約 28 万のヒアルロン酸が、イン・ビトロ (in vitro) でマクロファージの IL-12 産生を誘導したことが記載されている。

これに対し、J. Immunol. 165(4), p1863 - 1870 (2000) には、ヒアルロン酸のオリゴ糖 (4 糖～14 糖程度) は樹状細胞 (dendritic cell) の IL-12 産生を増加させるが、分子量 80,000～200,000 や分子量 1,000,000～600,000 のヒアルロン酸にはこのような作用がないことが記載されている。

このように、ヒアルロン酸による IL-12 産生の促進に関して種々のイン・ビトロの実験が行われてきているが、如何なる分子量のヒアルロン酸が IL-12 産生を促進するのかという知見については文献によってまちまちであり、未だ結論をみない。また、いずれの文献もイン・ビトロでのアプローチであり、実際に医薬、特に投与が最も簡単な「経口投与用の医薬」としての応用を見据えたアプローチはなされていない。

本発明は、ヒアルロン酸を有効成分とする IL-12 発現調節剤、IL-12 発現抑制剤、経口投与用の IL-12 発現増強剤、及び経口投与用の IL-12 発現調節剤を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、ヒアルロン酸が IL-12 の発現を調節すること、具体的には特定の重量平均分子量のヒアルロン酸が IL-12 の発現を抑制する作用を有し、これを使用することにより IL-12 発現抑制剤を提供し得ることを見出した。また本発明者は、ヒアルロン酸を経口投与することによっても上記効果を得られることを見出した。

さらに本発明者は、特定の重量平均分子量のヒアルロン酸が IL-1 2 の発現を増強する作用を有すること、さらにこの作用は経口投与によっても発揮されることを見出し、これにより経口投与用の IL-1 2 発現増強剤を提供し得ることを見出した。本発明はこれらの知見に基づき完成されたものである。

すなわち本発明は、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、IL-1 2 発現調節剤（以下、本発明調節剤という）を提供する。本発明調節剤は、IL-1 2 の発現を抑制し、または増強することができる。

また本発明は、重量平均分子量 60 万～300 万のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、IL-1 2 発現抑制剤（以下、本発明抑制剤という）を提供する。

本発明抑制剤に用いられるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量は 60 万～300 万の範囲内のものであるが、好ましくは 60 万～120 万、より好ましくは 70 万～120 万、より好ましくは 70 万～110 万、さらに好ましくは 80 万～110 万、特に好ましくは 80 万～100 万、非常に好ましくは 80 万～95 万の範囲内のものであり、80 万～90 万の範囲内のものが極めて好ましい。

本発明抑制剤は、IL-1 2 の產生を抑制することが望まれるあらゆる用途に利用することができる。例えば、細胞や組織の IL-1 2 発現抑制用の試薬、生体内の IL-1 2 の発現抑制が望まれる疾患に対する医薬・食品等として利用することもできる。

本発明抑制剤は、経口投与用であることが好ましい。

また本発明は、重量平均分子量 5 万～40 万のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、経口投与用の IL-1 2 発現増強剤（以下、本発明増強剤という）を提供する。

本発明増強剤に用いられるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量は 5 万～40 万の範囲内のものであるが、10 万～30 万の範囲内のものが好ましい。

本発明増強剤は、生体内の IL-1 2 の発現増強が望まれる疾患に対する経口

投与用の医薬や、食品等として利用することもできる。

また本発明はヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、経口投与用の I L-1 2 発現調節剤（以下、本発明経口剤という）を提供する。本発明経口剤は、I L-1 2 の発現を、経口投与によって抑制し、または増強することができる。

図面の簡単な説明

図1は、HAの経口投与による、血清IL-1 2 の減少を示す図である。

図2は、HAの経口投与による、血清IL-1 2 の増加を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

<1>ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩

本発明において用いるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の由来は特に限定されず、鶏冠、臍帶、ヒアルロン酸を産生する微生物等から分離、精製されたヒアルロン酸を用いることができる。特に、高純度に精製され、医薬や食品として混入が許されない物質を実質的に含まないものが好ましい。

ヒアルロン酸の薬学的に許容される塩としては、例えば、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、リチウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等の無機塩基との塩、またはジエタノールアミン塩、シクロヘキシルアミン塩、アミノ酸塩等の有機塩基との塩のうち、薬学的に許容される塩を用いることができる。なかでもヒアルロン酸ナトリウムであることが好ましい。

本発明調節剤を、I L-1 2 発現の抑制のために用いる場合については、以下の本発明抑制剤における説明と同様である。また、I L-1 2 発現の増強のために用いる場合については、以下の本発明増強剤の説明と同様である。したがって、本発明調節剤を I L-1 2 発現抑制のために用いる場合には以下の本発明抑制剤の説明を、また、本発明調節剤を I L-1 2 発現の増強のために用いる場合には、以下の本発明増強剤の説明を、それぞれ参照されたい。

また本発明経口剤を、I L-1 2 発現の抑制のために用いる場合については、

以下の本発明抑制剤における説明(経口投与に関する説明の部分)と同様である。また、IL-12発現の増強のために用いる場合については、以下の本発明増強剤の説明(経口投与に関する説明の部分)と同様である。したがって、本発明経口剤をIL-12発現抑制のために用いる場合には以下の本発明抑制剤の説明(経口投与に関する部分)を、また、本発明調節剤をIL-12発現の増強のために用いる場合には、以下の本発明増強剤の説明(経口投与に関する部分)を、それぞれ参照されたい。

本発明抑制剤において用いるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量は、60万以上、300万以下である限りにおいて特に限定されない。後述の実施例に示すように、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩は重量平均分子量84万～85万付近においてIL-12産生に対して優れた作用を示し、上記のような特定の重量平均分子量の範囲において効果を發揮するものである。本発明抑制剤に使用されるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量の下限は60万、好ましくは70万、より好ましくは80万であり、その上限は300万、好ましくは120万、より好ましくは110万、より好ましくは100万、さらに好ましくは95万、特に好ましくは90万である。本発明抑制剤に使用されるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量は、さらに好ましくは84万～90万程度である。

本発明抑制剤において用いる前記のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩は、約11.5～44dl/g、好ましくは約11.5～20dl/g、より好ましくは約13.0～20dl/g、より好ましくは約13.0～18.5dl/g、さらに好ましくは約14.5～17.5dl/g、さらに好ましくは約14.5～16.5dl/g、非常に好ましくは約14.5～16dl/g、極めて好ましくは約15～16dl/g程度の極限粘度を有するものである。なかでも15dl/g付近の極限粘度を有するものが好ましい。

上記のようなヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を用いることにより、優れた作用を有するIL-12発現抑制剤とすることができます。

一方、本発明増強剤において用いるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量は、5万以上、40万以下である限りにおいて特に限定されない。後述の実施例に示すように、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩は重量平均分子量10万～30万の範囲においてIL-12産生に対して優れた作用を示し、上記のような特定の重量平均分子量の範囲において効果を発揮するものである。

本発明増強剤に使用されるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量の下限は5万、好ましくは10万であり、その上限は40万、好ましくは30万である。

本発明増強剤において用いる前記のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩は、約2～8.5 d1/g、好ましくは約5～7 d1/g程度の極限粘度を有するものである。

上記のようなヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を用いることにより、優れた作用を有する経口投与用のIL-12発現増強剤とすることができる。

なお、本発明抑制剤又は本発明増強剤に使用されるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量は、第十三改正日本薬局方：一般試験法・第36項粘度測定法に従って極限粘度を測定し、Laurent らの式 (Biochim. Biophys. Acta, 42, 476(1960)) によって算出できる。

また、本発明抑制剤及び増強剤に使用されるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩中のエンドトキシン濃度の上限値は、本発明抑制剤及び本発明増強剤の具体的用途等に応じて適宜設定することができる。例えば、エンドトキシン非存在下で行うべき実験に用いるための試薬や、血管内に直接投与する医薬等として利用する場合には、溶液形態の剤とした場合において0.3 EU/mL以下であることが好ましい。また、本発明増強剤のように経口投与する場合には、経口投与に問題がない程度として適宜設定することができる。この場合、例えば溶液形態の剤とした場合においては0.3 EU/mL以下であることが好ましい。

エンドトキシン濃度は、当業者に周知慣用のエンドトキシンの測定法を用いて測定することができるが、カブトガニ・アメボサイト・ライセート成分を用いる

リムルス試験法が好ましい。なおEU(エンドトキシン単位)は、日本工業規格生化学試薬通則(JIS K 8008)に従って測定・算出できる。また、鉄含量は20 ppm以下であることが好ましい。

<2>本発明抑制剤又は本発明増強剤の剤型等

本発明抑制剤の、IL-1₂産生の抑制が望まれている細胞や組織への適用方法も、本発明抑制剤によるIL-1₂発現抑制効果が発揮される限りにおいて特に限定されず、本発明抑制剤の具体的用途等に応じて適宜選択することができる。例えば、細胞や組織の実験用試薬として用いる場合には、培養液等に本発明抑制剤を添加してこれを用いて細胞や組織を培養してもよいし、細胞や組織に本発明抑制剤を直接添加してもよい。

本発明抑制剤を医薬等として用いる場合には、例えば注射(静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内等)、経鼻、経口、経皮、吸入等の方法により投与することができる。このような投与方法に応じて、注射剤(溶液、懸濁液、乳濁液、用時溶解用固形剤等)、錠剤、カプセル剤、液剤、顆粒剤、散剤、リポ化剤、軟膏剤、硬膏剤、ローション剤、バスタ剤、貼付剤、ゲル剤、坐剤、外用散剤、スプレー剤、吸入散剤等として製剤化することができる。

本発明抑制剤中のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の濃度も特に限定されないが、0.5~10%(w/v)とするのが好ましい。特に本発明抑制剤を注射剤として提供する場合には、1~5%(w/v)程度とするのが好ましく、1~3%(w/v)程度とするのがより好ましく、1~2%(w/v)程度とするのがさらに好ましい。また本発明抑制剤を経口投与用の製剤、例えば液剤とする場合には、0.1%(w/v)以上とすることが好ましく、0.1~1%(w/v)程度とすることがより好ましい。

一方、本発明増強剤は、IL-1₂産生の増強が望まれている動物に適用するために経口投与されるものである。本発明増強剤は、経口投与の目的や対象等に応じて、錠剤、カプセル剤、液剤、顆粒剤、散剤、リポ化剤、吸入散剤等として製剤化することができる。

本発明増強剤中のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の濃度も特に限定されないが、0.5～10% (w/v) とするのが好ましい。例えば本発明増強剤を経口投与用の液剤とする場合には、0.5% (w/v) 以上とすることが好ましく、0.5～2% (w/v) 程度とすることがより好ましい。

本発明抑制剤及び本発明増強剤の製剤化は、公知の方法を用いることができる。また製剤化にあたり、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩に悪影響を与えることなく、他の医薬活性成分や、慣用の安定化剤、乳化剤、浸透圧調整剤、緩衝剤、等張化剤、保存剤、無痛化剤、着色剤、賦形剤、結合剤、滑潤剤、崩壊剤等、通常医薬に用いられる成分を使用できる。

<3> 本発明抑制剤又は本発明増強剤を医療用途に用いる場合の投与対象等

本発明抑制剤が投与される動物は、脊椎動物、特に哺乳動物が好ましく、とりわけヒトが好ましい。本発明抑制剤は、これらの動物における IL-1₂ 産生の抑制を目的とした医薬として投与することができる。IL-1₂ の産生の抑制を目的とする限りにおいて適用可能な疾患は限定されず、例えば、IL-1₂ がその病勢の進行に促進的に働く TH1 の活性化が病因となる疾患が例示される。このような疾患として具体的には、接触性皮膚炎、自己免疫性アレウト膜炎、アレルギー性脳脊髄膜炎、インスリン依存性糖尿病、糖尿病、橋本氏病、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、シェーベン症候群、クローン病、サルコイドーシス、乾癐、リポ多糖誘発肝臓死、半月体形成性腎炎、全身性エリテマトーデスなどが挙げられる。従って本発明抑制剤は、これらの疾患の処置剤としての思想をも包含する。本発明抑制剤を医薬として用いる場合、その投与は純然とした治療目的のみならず、疾患の予防、進行抑制（悪化防止）、軽減（症状の改善）等を目的とすることもできる。

本発明抑制剤におけるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の配合量、1回あたりの投与量、投与間隔等は、本発明抑制剤の投与方法、投与形態、使用目的等、患者の具体的な状況、年齢、性別、体重等に応じて個別に決定されるべき

事項であり特に限定されないが、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の臨床量として、注射による非経口投与の場合、成人1人1回当り5～25mg、1日当り10～50mg、経口投与の場合、成人1人1回当り50～250mg、1日当り100～500mg程度の投与量が例示される。また本発明抑制剤の投与間隔は、1日1回程度でもよく、1日2～3回に分けて投与することもできる。また1日～3日に1回程度投与してもよい。

本発明増強剤が投与される動物も、脊椎動物、特に哺乳動物が好ましく、とりわけヒトが好ましい。本発明増強剤は、これらの動物におけるIL-1₂産生の増強を目的とした医薬として経口投与することができる。IL-1₂の産生の増強を目的とする限りにおいて適用可能な疾患は限定されず、例えば、微生物感染による疾患、ウイルス疾患（例えば、 AIDSやC型肝炎等）、腫瘍（ガン）、IL-1₂の産生低下に起因する疾患などが挙げられる。従って本発明増強剤は、これらの疾患の処置剤としての思想をも包含する。本発明増強剤を医薬として用いる場合、その投与は純然とした治療目的のみならず、疾患の予防、進行抑制（悪化防止）、軽減（症状の改善）等を目的とすることもできる。

本発明増強剤におけるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の配合量、1回あたりの投与量、投与間隔等は、本発明増強剤の投与方法、投与形態、使用目的等、患者の具体的な状況、年齢、性別、体重等に応じて個別に決定されるべき事項であり特に限定されないが、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の臨床量として、注射による非経口投与の場合、成人1人1回当り5～25mg、1日当り10～50mg、経口投与の場合、成人1人1回当り50～250mg、1日当り100～500mg程度の投与量が例示される。また本発明増強剤の投与間隔は、1日1回程度でもよく、1日2～3回に分けて投与することもできる。また1日～3日に1回程度投与してもよい。

なおヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩は、医薬品、化粧品、食品等に既に利用されており、安全性が高いことが知られている。

実施例

以下に、本発明の実施例を具体的に説明する。しかしながら、これらにより本発明の技術的範囲が限定されるものではない。

[実施例 1] IL-12 の発現抑制について

< 1 > 被験物質

本実施例において用いた被験物質は以下の通りである。

- ・リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)。
- ・ヒアルロン酸ナトリウム (重量平均分子量 8.4 万 ; 極限粘度 15.0 dl/g)。以下、このヒアルロン酸ナトリウムを HA という。

HA は、以下の薬効薬理試験に応じて所定の濃度となるように PBS に溶解して用いた。PBS に溶解した後のエンドトキシン濃度はいずれも 0.3 EU/mL 以下であり、また鉄含量はいずれも 20 ppm 以下であった。

< 2 > 薬効薬理試験

(1) マクロファージにおける IL-12 p40 産生の減少

4 週齢の雄性 C57BL/6 マウス (日本チャールスリバー株式会社) の腹腔に 5 ~ 7 mL の氷冷ハンクス液を注入し、5 分後に回収することにより常在性腹腔細胞を採取した。採取した細胞を、96 穴平底プレートで、D MEM 培地により、37°C、5% CO₂ の条件下一晩培養した。培養後、浮遊細胞を除き、付着細胞を腹腔マクロファージとして実験に用いた。

種々の濃度の HA を含む培地に、IL-12 産生を刺激するためにリボ多糖 (LPS) (List Biological Laboratories, Inc.) を終濃度 1 μg/ml となるように添加して、細胞を 24 時間処理した。その後、細胞培養上清中の IL-12 (p40) の濃度を Mouse IL-12 (p40) ELISA キット (Endogen 社) を用いて測定し、IL-12 の産生を評価した。なお実験は 3 回行い、その平均値を算出した。結果を以下に示す。

表 1

無処理	LPS のみ	LPS + 10 μ g/ml HA	LPS + 100 μ g/ml HA
0 . 0	2 6 . 8	2 1 . 3	1 8 . 5

(単位 : pg/ml)

この結果から、重量平均分子量 8.4 万程度の高分子量ヒアルロン酸ナトリウムが、IL-12 産生を抑制することが示された。

またこれとは別個に、他の重量平均分子量（6.0万又は2.70万；極限粘度はそれぞれ 11.5dl/g, 40.5dl/g）のヒアルロン酸ナトリウム（100 μ g/ml）を用いて同様に実験を行った。実験は3回を行い、その平均値を算出した。

その結果、細胞培養上清中の IL-12 (p40) の濃度は、LPSのみの場合が 6.5, 1 pg/ml (4.6), LPS+重量平均分子量 6.0 万のヒアルロン酸ナトリウムの場合が 5.6, 0 pg/ml (5.1), LPS+重量平均分子量 2.70 万のヒアルロン酸ナトリウムの場合が 6.0, 0 pg/ml (7.7) であった。なおカッコ内の数字は標準誤差を示す。

この結果から、いずれのヒアルロン酸ナトリウムも IL-12 産生を有意に抑制するものではなかったものの、わずかながら抑制する傾向がみられた。そしてその傾向は分子量 6.0 万の方が若干高かった。

(2) HA投与による血清 IL-12 の減少

4 週齢の雄性 C57BL/6 系マウス（日本チャールスリバー株式会社）を入手し、PBS 投与群 ($n = 5$) と、HA 投与群 ($n = 5$) に分けた。

HA を 1.0 mg/ml 含有する PBS 溶液を、1 回あたり 8.0 mg/kg 体重となるように経口投与した。経口投与は、滅菌済の 1 ml ディスポーザブル注射筒および滅菌済み経ロゾンデを用いて常法により行った。投与は 1 日 2 回で 2 週間、毎日行った。

投与終了後、眼窩静脈叢から採血し、IL-12 (p40) の血漿中濃度を、Mouse IL-12 (p40) ELISA キット (Endogen 社) を用

いて測定し、平均値および標準偏差を算出した。結果を図1に示す。

この結果から、重量平均分子量84万程度の高分子量ヒアルロン酸ナトリウムを経口投与することによっても、IL-12産生を抑制できることが示された。

[実施例2] IL-12の発現増強について

<1>被験物質

本実施例において用いた被験物質は以下の通りである。

- ・リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)。
- ・ヒアルロン酸ナトリウム (重量平均分子量10万~20万; 極限粘度3dl/g ~5dl/g)。以下、このヒアルロン酸ナトリウムを「HA10-20」という。
- ・ヒアルロン酸ナトリウム (重量平均分子量約30万; 極限粘度約7dl/g)。以下、このヒアルロン酸ナトリウムを「HA30」という。

HAは、以下の薬効薬理試験に応じて所定の濃度となるようにPBSに溶解して用いた。PBSに溶解した後のエンドトキシン濃度はいずれも0.3EU/mL以下であり、また鉄含量はいずれも20ppm以下であった。

<2>薬効薬理試験

(1) HA10-20投与による血清IL-12の増加

4週齢の雄性C57BL/6系マウス(日本チャールスリバー株式会社)を入手し、PBS投与群(n=5)と、HA10-20投与群(n=5)に分けた。

HA10-20を10mg/m1含有するPBS溶液を、1回あたり80mg/kg体重となるように経口投与した。経口投与は、滅菌済の1mlディスポーザブル注射筒および滅菌済み経ロゾンデを用いて常法により行った。投与は1日2回で2週間行った。

投与終了後、眼窩静脈叢から採血し、IL-12(p40)の血漿中濃度を、Mouse IL-12(p40)ELISAキット(Endogen社)を用いて測定し、平均値および標準偏差を算出した。結果を図2に示す。

この結果から、重量平均分子量約10万~20万程度の低分子量ヒアルロン酸ナ

トリウムを経口投与することにより、IL-1₂産生を増強できることが示された。

(2) HA30 投与による血清 IL-1₂ の増加

4週齢の雄性 C57BL/6 系マウス（日本チャールスリバー株式会社）を入手し、PBS 投与群（n = 5）と、HA30 投与群（n = 5）に分けた。

HA30 を 100 μg / ml 含有する PBS 液を、1 回あたり 0.5ml（約 2.5mg/kg 体重）経口投与した。経口投与は、前記と同様に常法により行った。投与は 1 日 1 回で 13 日間、毎日行った。

投与終了後、眼窩静脈叢から採血し、IL-1₂ (p40) の血漿中濃度を前記と同様に測定し、平均値および標準誤差を算出した。結果（平均値±標準誤差）を以下に示す。

PBS 投与群 : 151.5 ± 18.4 (pg/ml)

HA30 投与群 : 212.8 ± 23.6 (pg/ml)

また Student's T 検定により、この結果は p < 0.05 で有意であった。

以上の結果から、重量平均分子量 30 万程度の低分子量ヒアルロン酸ナトリウムを経口投与することにより、IL-1₂ 産生を有意に増強できることが示された。

以上より、IL-1₂ の産生に関して分子量 60 万のヒアルロン酸は若干抑制する傾向がみられ、分子量 84 万のヒアルロン酸では顕著な抑制がみられ、分子量 270 万では極めてわずかながらも抑制する傾向がみられた。一方、分子量 10 万～30 万程度のヒアルロン酸ナトリウムは逆に IL-1₂ の産生を増強した。これらの結果を総合的に勘案すると、ヒアルロン酸は分子量 84 万付近を中心に前後 30 万程度（分子量 60 万～120 万）の範囲内で、IL-1₂ の発現抑制作用を発揮すると考えられる。

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にと

つて明らかである。

本出願は、2001年3月15日出願の日本特許出願（特願2001-074077）、2001年3月15日出願の日本特許出願（特願2001-074078）に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

産業上の利用可能性

ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする本発明調節剤は、IL-1₂の発現の調節（発現の抑制や増強）が望まれている細胞や組織の処置に極めて有用である。

特定の重量平均分子量の高分子量ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする本発明抑制剤は、前記薬効薬理試験の結果からも明らかな通り、IL-1₂の產生を抑制する効果を発揮することから、IL-1₂產生の抑制が望まれている細胞や組織の処置に極めて有用である。

特に、本発明抑制剤は経口投与によってもIL-1₂発現抑制作用を発揮でき、さらに天然物由来の物質を素材としていることからその安全性も高く、有用性が極めて高い。

一方、特定の重量平均分子量の低分子量ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする本発明増強剤は、前記薬効薬理試験の結果からも明らかな通り、経口投与によりIL-1₂の產生を増強する効果を発揮することから、IL-1₂產生の増強が望まれている動物の処置に極めて有用である。

特に本発明増強剤は、天然物由来の物質を素材としていることからその安全性も高く、有用性が極めて高い。

また本発明経口剤は、経口投与により患者に簡便に投与できることから、極めて有用である。

請求の範囲

1. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、インターロイキン12発現調節剤。
2. 重量平均分子量60万～300万のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、インターロイキン12発現抑制剤。
3. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量が60万～120万の範囲にある、請求の範囲第2項に記載の抑制剤。
4. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量が70万～120万の範囲にある、請求の範囲第2項に記載の抑制剤。
5. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量が70万～110万の範囲にある、請求の範囲第2項に記載の抑制剤。
6. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量が80万～110万の範囲にある、請求の範囲第2項又は第3項に記載の抑制剤。
7. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量が80万～100万の範囲にある、請求の範囲第2項又は第3項に記載の抑制剤。
8. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量が80万～95万の範囲にある、請求の範囲第2項又は第3項に記載の抑制剤。
9. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量が80万～90万の範囲にある、請求の範囲第2項又は第3項に記載の抑制剤。

WO 02/074318

PCT/JP02/02433

10. 経口投与用である、請求の範囲第2項～第9項のいずれか1項に記載の抑制剤。

11. 重量平均分子量5万～40万のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、経口投与用のインターロイキン12発現増強剤。

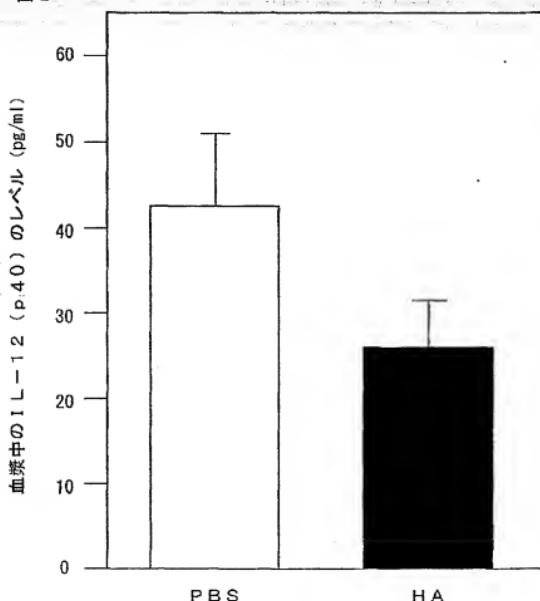
12. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の重量平均分子量が10万～30万の範囲にある、請求の範囲第11項に記載の増強剤。

13. ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、経口投与用のインターロイキン12発現調節剤。

WO 02/074318

PCT/JP02/02433

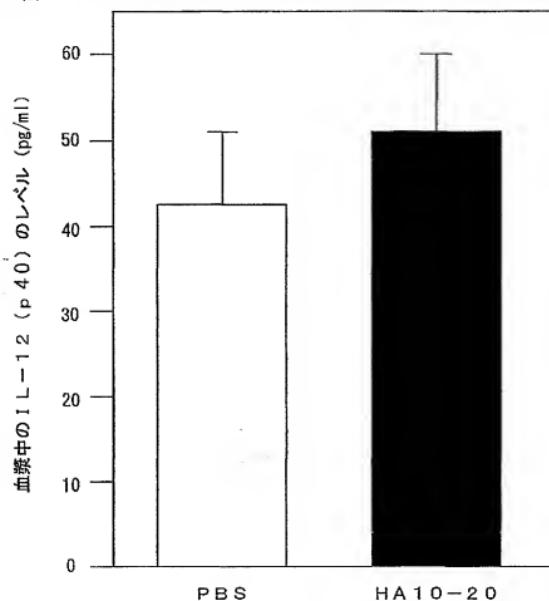
図 1



WO 02/074318

PCT/JP02/02433

図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁷ A61K31/728, A61P43/00, 17/00, 27/02, 37/08, 37/04, 3/10,
25/00, 29/00, 19/02, 17/06, 13/12, C08B37/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ A61K31/728, C08B37/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Hodge-Dufour, Jennifer; Noble, Paul W.; Horton, Maureen R.; Bao, Clare; Wysoka, Maria; Burdick, Marie D.; Strieter, Robert M.; Trinchieri, Giorgio; Pure, Ellen, Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages, J. Immunol. (1997), 159(5), 2492-2500	1,11-13 2-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 April, 2002 (19.04.02)Date of mailing of the international search report
30 April, 2002 (30.04.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/02433

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl' A61K31/728, A61P43/00, 17/00, 27/02, 37/08, 37/04,
 3/10, 25/00, 29/00, 19/02, 17/06, 13/12, C08B37/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K31/728, C08B37.08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーキー	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Hodge-Dufour, Jennifer; Noble, Paul W.; Horton, Maureen R.; Bao, Clare; Wysoka, Maria; Burdick, Marie D.; Strieter, Robert M.; Trinchieri, Giorgio; Pure, Ellen, Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages, J. Immunol. (1997), 159(5), 2492-2500	1, 11-13
A		2-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論

の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 19. 04. 02	国際調査報告の発送日 30.04.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 審査番号 100-8915 東京都千代田区麹町三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内藤伸一 電話番号 03-3581-1101 内線 3492 4P 8615